

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 06-157559
 (43)Date of publication of application : 03.06.1994

(51)Int.Cl.

C07F 9/10

A61K 9/127

(21)Application number : 04-313648

(71)Applicant : MITSUBISHI KASEI CORP

(22)Date of filing : 24.11.1992

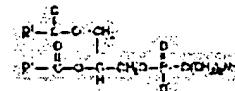
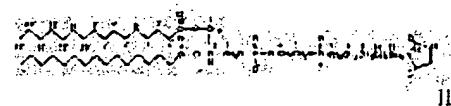
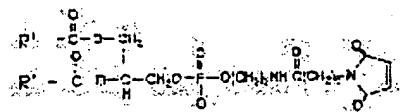
(72)Inventor : TAGAWA TOSHIAKI
 AWANE KAORU
 NAGAIKE KAZUHIRO

(54) PHOSPHOLIPID DERIVATIVE

(57)Abstract:

PURPOSE: To obtain a new compound useful for liposomes capable of easily and stably conjugating or introducing functional compounds such as proteins or peptides.

CONSTITUTION: The objective compound of formula I (R1 and R2 are each 11-19C alkyl or alkenyl), e.g. a compound of formula II. The compound of the formula I can be obtained by reaction between a compound of formula III and a compound of formula IV in the presence of a basic compound such as triethylamine in an organic solvent such as methanol. Using the compound of the formula I, liposomes can be obtained.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 09.09.1999

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-157559

(43)公開日 平成6年(1994)6月3日

(51)Int.Cl.⁵C 07 F 9/10
A 61 K 9/127

識別記号

B 7537-4H
F 7329-4C

F I

技術表示箇所

審査請求 未請求 請求項の数2(全5頁)

(21)出願番号

特願平4-313648

(22)出願日

平成4年(1992)11月24日

(71)出願人 000005968

三菱化成株式会社

東京都千代田区丸の内二丁目5番2号

(72)発明者 田川 俊明

神奈川県横浜市緑区鶴志田町1000番地 三

菱化成株式会社総合研究所内

(72)発明者 粟根 かおる

神奈川県横浜市緑区鶴志田町1000番地 三

菱化成株式会社総合研究所内

(72)発明者 長池 一博

神奈川県横浜市緑区鶴志田町1000番地 三

菱化成株式会社総合研究所内

(74)代理人 弁理士 長谷川 晓司

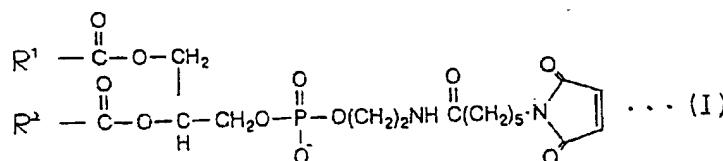
(54)【発明の名称】 リン脂質誘導体

(57)【要約】

【構成】下記一般式(I)で表わされるリン脂質誘導体

およびこれを含有してなるリポソーム。

【化1】

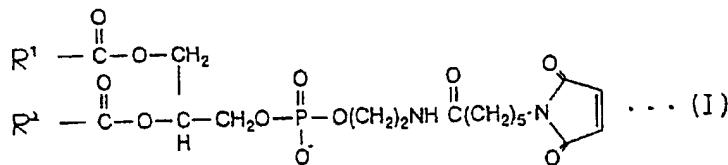
(上記式中、R¹およびR²はそれぞれ独立してC₁₁~C₁₈のアルキル基またはアルケニル基を表す)

【効果】本発明のリン脂質誘導体によれば、これを用い

てリポソームを形成する際に蛋白質、ペプチド等の機能性化合物を容易かつ安定に結合(導入)することができる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 下記一般式(I)で表されるリン脂質誘導体。



(上記式中、R¹およびR²はそれぞれ独立してC₁₁～C₁₉のアルキル基またはアルケニル基を表す)

【請求項2】 請求項1記載のリン脂質誘導体を含有してなることを特徴とするリポソーム。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、新規なリン脂質誘導体およびそれを用いたリポソームに関し、詳細にはマレイミドカプロイル基を有することにより安定化されたフォスファチジルエタノールアミン誘導体およびそれを用いたリポソームに関する。

【0002】

【従来の技術および発明が解決しようとする課題】 脂質膜小球体であるリポソームは、水溶性、疎水性に限らず多くの物質を包含できることから、キャリアーとして、特にドラッグ デリバリー システム (DDS) 用のキャリアーとして高い関心がもたれている。近年、リポソーム本来の特性に加え機能性を付与する目的でリポソーム表面へ蛋白質、ペプチド、糖、親水性高分子等の機能性化合物を結合（導入）する試みが行われている。

【0003】 このような機能性付与には、リポソーム上のリン脂質とかかる機能性化合物との結合技術が必要かつ重要な要素であり、多くの方法が提唱されてきた。例えば蛋白質やペプチドを結合（導入）しようとした場合、これらの中に内在するシステイン残基のチオール基の反応性を利用して

■ N- (3- (2-ピリジルジチオ) プロピオニル) フォスファチジルエタノールアミン (PDP-PE; N ature, 288, 602 (1980)、Bi ochemistry, 20, 4229 (1981)) のように、リン脂質自体にS-S結合を導入し、これと蛋白質やペプチドのチオール基との間で強固なS-S結合を形成させる方法、■ N- (m-マレイミドベンゾイル) ジパルミトイルフォスファチジルエタノールアミン (M

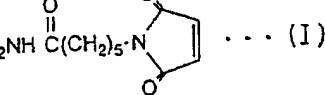
10

20

30

【化1】

導体。



B-PE; Cancer Research, 43, 5328 (1983)、N- (4- (p-マレイミドフェニル) ブチリル) フォスファチジルエタノールアミン (MPB-PE; The Journal of Biological Chemistry, 257, 286 (1982)) のように、マレイミド基等の反応性の高い二重結合を有する置換基をリン脂質に導入し、これと蛋白質やペプチドのチオール基との間で強固なチオエーテル結合を形成させる方法等である。これらのうちで後者■の方法は、凝集体形成が少ないので、蛋白質またはペプチドが抗体である場合にその活性低下が少ないので、封入薬剤が限界されない等の利点からより多くの研究が行われている。

【0004】 しかしその反面、4- (p-マレイミドフェニル) ブチリル基を含有するリポソームの場合、内封物のものを引き起こすこと (Bi ochemistry, 25, 5693 (1986))、またマレイミド基の安定性が高くなないこと (J. Immunol. Method, 132, 25 (1990)) 等が指摘されており、必ずしも十分に満足のゆくリポソームは得られていないのが現状であった。

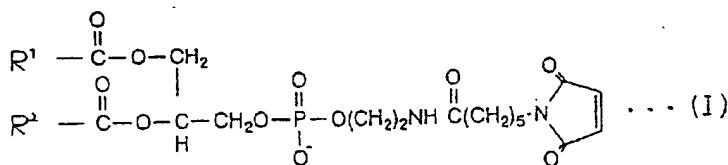
【0005】

【課題を解決するための手段】 本発明者らは、かかる従来のリン脂質-マレイミド誘導体の問題点を解決すべく検討した結果、ε-マレイミドカプロン酸部分とフォスファチジルエタノールアミン部分からなるリン脂質誘導体（以下「MC-PE」と略記することもある）がリポソームを構成する成分として極めて安定であることを見い出し、本発明を完成するに至った。

【0006】 すなわち本発明の要旨は、下記一般式(I)で表されるリン脂質誘導体およびそれを含有してなるリポソームに存する。

【0007】

【化2】



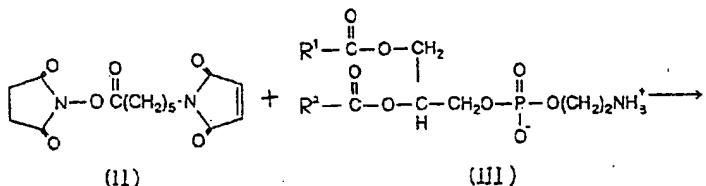
【0008】 (式中、R¹およびR²はそれぞれ独立してC₁₁～C₁₉のアルキル基またはアルケニル基を表す) 以

下、本発明につき詳細に説明する。本発明のリン脂質誘導体は、前記一般式(I)で表される。R¹およびR²に

3

における $C_{11} \sim C_{19}$ のアルキル基としては、ラウロイル基、ミリストイル基、パルミトイyl基、ステアロイル基等が挙げられ、 $C_{11} \sim C_{19}$ のアルケニル基としてはオレイル基等が挙げられる。本発明においては、 $C_{13} \sim C_{11}$ であることが好ましく、特にパルミトイyl基であることより好ましい。

〔0009〕次に、本発明のリン脂質誘導体の製造法に



〔0 0 1 1〕 (式中、 R' および R'' は前記定義と同じ)

(I I) 式で示される $N - (\epsilon - \text{マレイミドカプロイルオキシ})$ スクシンイミド (以下、「EMCS」と略記することもある) と (I I I) 式で示される フォスファチジルエタノールアミンとを、トリエチルアミン、ピリジン等の塩基性化合物の存在下、メタノール、クロロホルム

について説明する。本発明のリン脂質誘導体は、例えば以下に示す(1)または(2)の方法により合成することができます。

(1)

[0010]

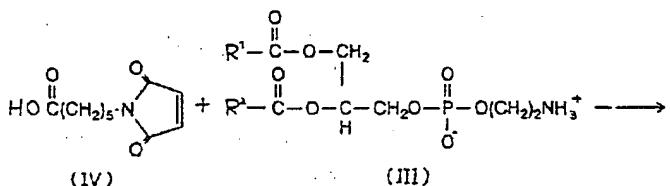
[化3]

ムーメタノール (1/1~10/1) 等の有機溶媒に溶解し、20~40°Cで窒素ガス、アルゴンガス等の不活性ガスの条件下で反応させる。

[001.2] (2)

[0013]

【化4】



〔0014〕 (式中、 R' および R'' は前記定義に同じ)

(IV) 式で示される ϵ -マレイミドカブロン酸と (I) 式のフォスファチジルエタノールアミンとを、通常のペプチド合成反応（例えば、タンパク質化学 1, 5. 3 ペプチド結合形成反応、共立出版株式会社発行 (1969) に記載のカルボジイミド法、アジド法、イソシアナート法等）で縮合反応させる。

【0015】かくして得られる本発明のリン脂質誘導体は、薄層クロマトグラフィー、シリカゲルクロマトグラフィー等の常法の分離・精製手段を用いて精製することができる。さらにMC-PEは、公知の方法を用いリポソーム化することができる。例えば、フォスファチジルコリン、コレステロールおよび本発明のMC-PEを構成成分とし、必要に応じてジパルミトイルフォスファチジン酸等のフォスファチジン酸を加えることができる。具体的には、ジパルミトイルフォスファチジルコリン (DPPC)、コレステロール (Chol) およびMC-PEから構成されるリポソームが挙げられる。各構成成分の使用割合は、フォスファチジルコリン 1 mol に対しコレステロールは 0.3 ~ 1 mol、好ましくは 0.4 ~ 0.6 mol、MC-PE は 0.005 ~ 0.3 mol、好ましくは 0.01 ~ 0.1 mol、フォスファチジン酸を加える場合は 0.4 mol 以下、好ましくは 0.15 mol 以下の組成比で用いられる。

【0016】次にこれらを、例えば溶媒を除去した脂質

10

20

30

混合物を水和しホモジナイザー等で乳化後、凍結融解しマルチラメラリポソームを得る。さらに超音波処理、高速ホモジナイズ、あるいは均一なポアサイズを有するメンブランで加圧ろ過する方法 (Biophysica Acta, 812, 55 (1985)) 等により、適当な粒径に調整してもよい。このときの好ましい粒径としては、10~300 nm、より好ましくは30~200 nmである。

【0017】かかるリポソームは、各種の薬剤を封入することもできる。薬剤としては、アドリアマイシン、ダウノマイシン、マイトマイシン、シスプラチニン、ビンクリスチン、エピルピシン、メトトレキセート、5-フルオロウラシル、アクラシノマイシン等の抗ガン剤、ゲンタマイシン等のアミノ配糖体やスルペニシリン等の β -ラクタム系抗生物質、リシンA、ジフテリアトキシン等の毒素、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)、B型肝炎ウイルス(HBV)、C型肝炎ウイルス(HCV)、ras遺伝子に対するアンチセンスRNA等が挙げられる。これらの薬剤をリポソーム内に封入するには、水溶性薬剤の場合は脂質を薬剤水溶液で水和することによって、また脂溶性薬剤の場合はいったん揮発性の有機溶媒に薬剤と脂質とを混合し、溶媒を留去した後得られる薬剤・脂質混合物を水和することによって、リポソーム内に包埋することができる。

【0018】またリポソームに機能性を付与する目的

で、前述の通りリポソーム表面へ蛋白質、ペプチド、糖、親水性高分子等を結合（導入）することが好ましい。本発明においては、各種抗体、線維芽細胞成長因子（FGF）、上皮細胞成長因子（EGF）等の各種成長因子または増殖因子等の蛋白質を結合（導入）することが好ましく、特に好ましいのは抗体である。抗体は、治療対象となる組織、細胞、細菌ウイルス等と反応性を有する抗体（IgA、IgG、IgM等）であり、各種動物のポリクローナル抗体、マウスモノクローナル抗体、ヒトマウスのキメラ型抗体、ヒト型のモノクローナル抗体等を用いることができる。

【0019】これらの蛋白質とリポソームとの結合には、チオール基を利用するすることが望ましい。具体的には、蛋白質のアミノ基に対し通常蛋白質のチオール化に用いるN-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオネート（Bioc hem. J., 173, 723 (1978)）やイミノチオラン、メルカプトアルキルイミデート（Bioc hemistry, 12, 3266 (1973)）等の化合物を用いて行う方法、蛋白質が抗体である場合は内在するシステイン残基のジチオール基を還元してチオール基とする方法等が挙げられる。抗体の中でもIgGを用いる場合は、ペプシン等の酵素処理によってF(ab')₂化し、さらにジチオスレイトール等で還元して得られるF(ab')₂に生じるチオール基をリポソームとの結合に供するのがよい（Bioc hemistry, 20, 4229 (1981)）。IgMの場合は、ミラーらの方法（J. Bioc hem., 257, 286 (1965)）に準じ、穏和な条件下でJ鎖を還元して得られるIgMsのFc部分のチオール基をリポソームとの結合に供するのがよい。リポソームとかかる蛋白質との結合は、中性の適当な緩衝液（pH 6.5~7.5）中、2~16時間程度反応することにより達成される。

【0020】本発明のリポソームを医薬組成物として使用するに当たっては、各種疾患に対し血管内投与法、膀胱内投与法、腹くう内投与法、局所投与法等により投与することができる。またその投与量は、目的とする薬理作用、薬剤の種類等により、適宜調製することができる。

【0021】
【実施例】以下、本発明につき実施例を挙げてより具体的に説明するが、その要旨を越えない限り以下に限定されるものではない。

実施例 1
ジパルミトイフルフォスファチジルエタノールアミン 1.27mg、N-(ε-マレイミドカプロイルオキシ)スクシンイミド（EMCS；同人化学社製）8.0mgおよびトリエチルアミン4.4μlをクロロホルム/メタノール溶液（5/1）に加え、窒素気流下で反応させた。3時間後、さらに2.0mgのEMCSを追加し、室温で3

時間反応させた。

【0022】反応溶液のニンヒドリン反応が陰性になり、アミン（ジパルミトイフルフォスファチジルエタノールアミン）が検出されなくなったことを確認後、減圧乾固し、少量のクロロホルムに再溶解した。飽和NaClで数回洗浄後、分液したクロロホルム層を硫酸ナトリウムで乾燥し、シリカゲルカラムで分離精製した。クロロホルム/メタノールの段階的溶出を行い、收率70%で目的物（一般式（1）において、R1およびR2が共にパルミトイル基を表す化合物：MC-DPPE）を得た。

【0023】合成されたMC-DPPEはTLCで单一スポットを示した。また構造は¹³C-NMRおよび¹H-NMRにより確認した（表1参照）。

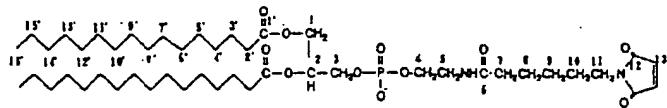
【0024】

【表1】

表1

Number	¹ H (ppm)	¹³ C (ppm)
1	3.90	62.8
2	5.20	70.6
3	4.15, 4.49	64.8
4	3.40	40.5
5	3.85	63.5
6	-	173.8
7	2.18	36.0
8	2.28	34.2
9	1.58	28.2
10	2.28	34.2
11	3.45	37.6
12	-	171.0
13	6.71	134.1
1'	-	173.8
2'	1.57	25.0
3'	1.28	29.4
4'	1.28	29.4
5'	1.28	29.4
6'	1.28	29.4
7'	1.28	29.4
8'	1.28	29.4
9'	1.28	29.4
10'	1.28	29.4
11'	1.28	29.4
12'	1.28	29.4
13'	1.28	29.4
14'	1.28	29.4
15'	1.28	29.4
16'	0.87	14.1

【化5】



【0026】実施例 2

ジパルミトイルフォスファチジルエタノールアミン 100 mg、マレイミドカプロン酸 44.4 mg (シグマ社製)、ジシクロヘキシルカルボジイミド 43.3 mg およびヒドロキシベンゾトリアゾール 32.2 mg をクロロホルム 20 ml に添加し、0°Cにて1時間混合した。ついで20時間攪拌し反応させた。これをシリカゲルカラムを用い分画しMC-DPPEを得た。收率は、38%であった。

実施例 3

ジパルミトイルフォスファチジルコリン (DPPC)、コレステロール (Chol) およびMC-DPPE (モル比で 18/10/0.5) からなるクロロホルム溶液を (脂質総量 50 mg) をナス型フラスコに加え、ロータリーエバポレーターで溶媒を留去した。生じた脂質フィルムに 0.15 M NaCl を含有する 10 mM リン酸緩衝液 pH 7.4 (PBS) 1 ml を加え、60°C加温下激しく浸透した。さらに 200 nm のメンブランフィルターを装着した EXTRUDER™ (日油リボーム社製) を用い整粒し、MC-DPPE 含有リポソームを得た。

【0027】作製されたリポソームを 37°C で各時間 (1, 2, 4, 8, 24 時間後) インキュベート後、マレイミド基量を測定した。マレイミド基は、リポソームに既知量のシステインを添加し室温 15 分反応後、超遠心によりリポソームを分離、上清の残存システイン量を 4, 4' ジチオピリジンで定量し、リポソーム未添加のそれを対照としてマレイミド基量を算出した。

【0028】その結果、MC-DPPE を含有した本発明のリポソームのマレイミド量は 24 時間後においても安定であった。

比較例

実施例 3において MC-DPPE を MB-PE にすること以外は上述と同様にして作製したリポソームのマレイミド量を同様に測定したところ、8 時間後には検出不能となった。

実施例 4

実施例 3と同様に作製した脂質フィルムに、0.1 M カルボキシフルオレッセイン溶液を 1 ml を加え同様にリポソームを作製した。リポソームをインキュベート後、超遠心によりリポソームを分離、リーク (封入物の漏れ) により生じる上清のカルボキシフルオレッセイン量を蛍光により測定した。その結果、DPPC の相転移温度近傍の 45°C においてもリーク量が 3% 以下であることが示された。

実施例 5

マウスモノクローナル抗体 (IgG₁) を 0.1 M 酢酸緩衝液 pH 3.5 で 1/40 mol 量のペプシン (Cooper Biomedical 社製) を加え、37°C で一夜反応して F(ab')₂ に切断した。

【0029】さらに陽イオン交換樹脂 (mono-S, ファルマシア社製) によるクロマト分離で F(ab')₂ を単離した。すなわち 0.1 M 酢酸緩衝液 pH 4.0 中 0 から 1.0 M NaCl の直線的濃度勾配により行った。さらに 0.15 M NaCl を含む 0.1 M 酢酸緩衝液 pH 4.5 で、抗体 1 mg につき 10% DTT 1.2 μl を加え、室温で 80 分間還元することで F(ab')₂ を得た。反応後 PBS に平衡化したゲルろ過カラム (PD-10 ファルマシア社製) で脱塩しリポソーム結合に供した。

【0030】上記実施例 3 と同様の組成で脂質総量 100 mg にして得られるリポソームに、5 mg の割合で F(ab')₂ を加え、37°C で 8 時間反応させることでイムノリポソームを作製した。得られたリポソームはセファロース CL-6B カラム (ファルマシア社) でゲルろ過し未反応の抗体を除去後、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動を行い抗体の結合を確認した。

【0031】

【発明の効果】本発明のリン脂質誘導体によれば、これを用いてリポソームを形成する際に蛋白質、ペプチド等の機能性化合物を容易かつ安定に結合 (導入) することができる。